

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-247978

(P2000-247978A)

(43) 公開日 平成12年9月12日 (2000.9.12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 7 D 487/22		C 0 7 D 487/22	4 C 0 5 0
A 6 1 P 35/00		A 6 1 K 31/00	6 3 5 4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/4439		31/44	6 1 3

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平11-47517

(22) 出願日 平成11年2月25日 (1999.2.25)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年8月25日  
 社団法人日本生化学会発行の「生化学第70巻第8号」に  
 発表

(71) 出願人 000222118

東洋インキ製造株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番13号

(71) 出願人 599026393

川上 浩良

東京都八王子市上柚木3丁目11番南大沢学  
園6番街1-401

(72) 発明者 川上 浩良

東京都八王子市上柚木3丁目11番南大沢学  
園6番街1-401

(74) 代理人 100102668

弁理士 佐伯 憲生

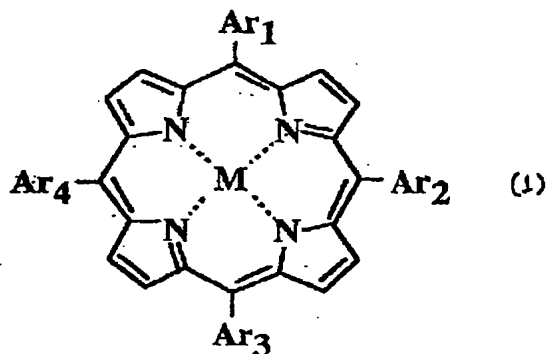
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 金属ポルフィリン錯体及びそれを含有してなる医薬組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【解決手段】 新規な一般式1のカチオン性金属ポルフィ  
 リン錯体、およびそれを含有する医薬組成物。

の場でヒドロキシラジカルに変換できるヒドロキシラジ  
 カル誘発剤及び製薬上許容される担体からなる医薬組成  
 物に使用できる。



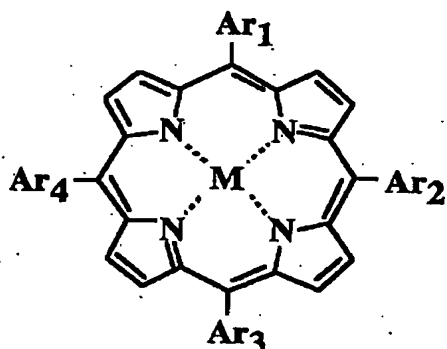
(Mは錯体を形成する金属原子、Ar<sub>1</sub>~Ar<sub>4</sub>は独立  
 して置換基を有してもよい炭素環又は複素環式芳香族基  
 を示し、そのうち1個以上はカチオン性の基を有する芳  
 香族基である。)

【効果】 錯体はヒドロキシラジカル誘発剤として有用で  
 あり、抗癌剤に使用できる。また生体内の活性酸素をそ

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)

【化1】



(式中、Mは錯体を形成するための金属原子を示し、Ar<sub>1</sub>、Ar<sub>2</sub>、Ar<sub>3</sub>、及び、Ar<sub>4</sub>はそれぞれ独立して置換基を有してもよい炭素環式又は複素環式芳香族基を示し、Ar<sub>1</sub>、Ar<sub>2</sub>、Ar<sub>3</sub>、及び、Ar<sub>4</sub>の少なくとも1個はカチオン性の基を有する芳香族基である。)で表されるカチオン性金属ポルフィリン錯体。

【請求項2】 Mが、鉄原子、銅原子又はマンガン原子である請求項1に記載のカチオン性金属ポルフィリン錯体。

【請求項3】 Ar<sub>1</sub>、Ar<sub>2</sub>、Ar<sub>3</sub>、及び、Ar<sub>4</sub>の少なくともひとつが、N-低級アルキル-4-ピリジル基である請求項1又は2に記載のカチオン性金属ポルフィリン錯体。

【請求項4】 N-低級アルキル-4-ピリジル基が、N-メチル-4-ピリジル基である請求項3に記載のカチオン性金属ポルフィリン錯体。

【請求項5】 Ar<sub>1</sub>、Ar<sub>2</sub>、Ar<sub>3</sub>、及び、Ar<sub>4</sub>の少なくともひとつが、4-N, N, N-トリ低級アルキルアミノフェニル基である請求項1又は2に記載のカチオン性金属ポルフィリン錯体。

【請求項6】 4-N, N, N-トリ低級アルキルアミノフェニル基が、4-N, N, N-トリメチルアミノフェニル基である請求項5に記載のカチオン性金属ポルフィリン錯体。

【請求項7】 請求項1～6のいずれかに記載のカチオン性金属ポルフィリン錯体を含有してなる医薬組成物。

【請求項8】 請求項1～6のいずれかに記載のカチオン性金属ポルフィリン錯体を含有してなるヒドロキシラジカル誘発剤。

【請求項9】 請求項1～6のいずれかに記載のカチオン性金属ポルフィリン錯体を含有してなる抗癌剤。

【請求項10】 生体内の活性酸素をヒドロキシラジカルに変換することができるヒドロキシラジカル誘発剤を含有してなる医薬組成物。

【請求項11】 医薬組成物が抗癌剤である請求項10に記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なカチオン性金属ポルフィリン錯体、それを含有してなる医薬組成物に関する。より詳細には、本発明の医薬組成物は、SOD活性化剤や抗癌剤として有用なものである。本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体は癌細胞に集積されやすく、副作用の少ない選択的な各種腫瘍の治療剤として有用である。

【0002】

【従来の技術】近年、癌治療の方法として薬剤による化学療法が多く用いられるようになった。しかし、多くの薬剤は、癌細胞のみへの特異性を持たないため癌細胞とともに正常細胞にも作用を及ぼし、このために激しい副作用を起こし、化学療法が必ずしも有効に働いているとは言えないのが現状である。例えば、臨床で用いられている抗癌剤のひとつであるシスプラチンは子宮癌に有効であることが臨床的に示されているが、有効性と共に多くの副作用も報告されている。また、インターフェロンやTNFやCSFなどの生理活性蛋白質が、癌特異性を有することから注目されていたが、抗癌作用自体が充分でないことや、経口投与できないことなどから抗癌剤として広く使用されるに至っていない。

【0003】ところで、生体内で誘発する活性酸素種は、生体内に侵入した異種生物を死滅させるなど生体の生理活性を維持してゆく上で大きな働きをしているのであるが、同時に必要以上に生体内で生成した活性酸素種は自己の組織をも破壊することがあり、必要以上の活性酸素の生成は、有害であるばかりでなく老化の一因であるともいわれている。この活性酸素種の毒性を利用して、生体内の酸素を活性酸素種に変換して癌細胞を非特異的に攻撃することにより、癌細胞を死滅させる抗癌剤も開発されているが、非特異的であり正常細胞をも攻撃することから多くの副作用を引き起こしている。

【0004】一方、ある種のポルフィリン系化合物が癌細胞などに集積し、これにレーザー光を照射することにより、生体内の酸素を活性化させて活性酸素種を生成させて癌細胞を死滅させることが見出され、比較的特異性の高い抗癌剤のひとつとして使用されてきているが、レーザー光を病巣部に照射させなければならず、病巣部が内部にある場合には効果がないなどの欠点を有するものである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、癌細胞に特異的に作用する新規な作用機構に基づく、副作用の少ない抗癌剤を提供するものである。癌細胞では正常細胞に比べて、そのSOD活性が低下しており活性酸素の放出量が増加していることが報告されている(A.V.Peskin, et al., FEBS Lett., 78, 41 (1977); V.Leroyer, et al., Cancer Res., 47, 4771 (1987))。本発明者らは、

この点に着目し、癌細胞が放出する活性酸素を、その場でより高い反応性を有するヒドロキシラジカル( $\cdot\text{O}\cdot\text{H}$ )に変換することができれば、癌細胞を特異的に攻撃することができる新しい抗癌メカニズムを構築することができると考えた。

【0006】本発明者らは、新規な金属ポルフィリン錯体が優れたSOD活性を有し、かつ、癌細胞に特異的に集積する性質を有し、活性酸素と反応してヒドロキシラジカルを誘発させ癌細胞を特異的に死滅させることができることを見出した。即ち、本発明は、副作用が少なく安全性の高いSOD活性を有する新規なカチオン性金属ポルフィリン錯体を提供する。また、本発明の新規なカチオン性金属ポルフィリン錯体は、癌細胞に特異的に集積するために、副作用の少ない抗癌剤として有用であり、本発明は新規な抗癌剤を提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、次の一般式(1)

【0008】

【化2】

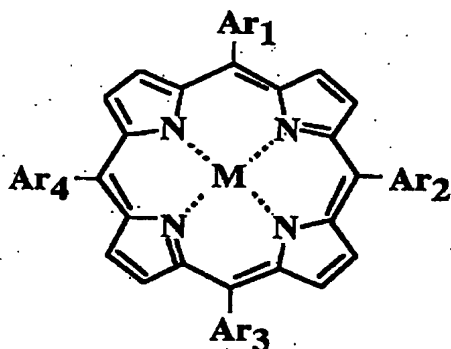


表1 癌細胞と正常細胞におけるSOD活性の比較

細 胞	I C <sub>50</sub> [ $\times 10^3$ U/mg蛋白質]
LLC-WRC-256細胞	8 ± 0.6
BRL-3A細胞	22 ± 1.2
Cu, Zn-SOD	760 ± 45

【0012】このように癌細胞においては、正常細胞に比べてSOD活性が大きく低減している。本発明の前記一般式(1)で表されるカチオン性金属ポルフィリン錯体は、SOD活性を有しており、生体内でスーパーオキシドラジカルと特異的に反応し過酸化水素を生成する。さらに、本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体は、中心に金属を有しているために、生成した過酸化水素がハーバー・バイス型反応を起こし、極めて毒性の高いヒドロキシラジカルを生成し、癌細胞のみを特異的に攻撃する。

【0013】一方、生体内の抗酸化酵素が機能している正常細胞の場合には、スーパーオキシドラジカルがほと

(式中、Mは錯体を形成するための金属原子を示し、Ar<sub>1</sub>、Ar<sub>2</sub>、Ar<sub>3</sub>、及び、Ar<sub>4</sub>はそれぞれ独立して置換基を有してもよい炭素環式又は複素環式芳香族基を示し、Ar<sub>1</sub>、Ar<sub>2</sub>、Ar<sub>3</sub>、及び、Ar<sub>4</sub>の少なくとも1個はカチオン性の基を有する芳香族基である。)で表されるカチオン性金属ポルフィリン錯体に関する。

【0009】また、本発明は、前記一般式(1)で表されるカチオン性金属ポルフィリン錯体及び製薬上許容される担体からなる医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物は、ヒドロキシラジカル誘発剤であるばかりでなく、抗癌剤として使用することができる。さらに、本発明は生体内の活性酸素を、その場でヒドロキシラジカルに変換することができるヒドロキシラジカル誘発剤及び製薬上許容される担体からなる医薬組成物、特に抗癌剤に関する。

【0010】癌細胞は、正常細胞にくらべ抗酸化酵素(SOD、カタラーゼ等)が欠落していることが知られており、このために癌細胞は正常細胞に比べてスーパーオキシドラジカルを多量に発生している。例えば、癌細胞のLLC-WRC-256細胞と、正常細胞のBRL-3A細胞、及び、天然の抗酸化酵素(Cu, Zn-SOD)のSOD活性を測定すると次の表1のようになる。

【0011】

【表1】

んど発生しておらず、正常細胞においては本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体が仮に存在していても、スーパーオキシドラジカルと反応することができずヒドロキシラジカルを生成することができない。したがって、本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体は、選択的かつ優れたSOD活性を持つヒドロキシラジカル誘発剤であるため副作用の少ない癌細胞特異性の高い新しい抗癌剤として極めて有用なものである。

【0014】本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体は、ポルフィン骨格に4個の芳香族基を有するものであり、かつ、4個の芳香族基のうちの少なくとも1個にカチオン性の基を有していることを特徴とするものであ

る。4個の芳香族基は、それぞれ独立して、炭素環式のものであっても複素環式のものであってもよく、単環式のもでも多環式のものであってもよい。芳香族基としては、炭素環式のものとしては例えば、ベンゼン環、ナフタレン環などから誘導される基であり、複素環式のものとしては、1個又は2個以上の窒素原子、酸素原子又は硫黄原子を有する5～10員の単環式又は縮合環式の複素環から誘導される基であり、例えば、ピリジン環、ピリミジン環、アゾール環などから誘導される基である。好ましい芳香族基としては、フェニル基や4-ピリジル基などが挙げられる。

【0015】これらの芳香族基はSOD活性や抗癌作用に悪影響を与えない置換基を有していてもよい。芳香族基における置換基としては、炭素数1～10、好ましくは1～6の直鎖又は分枝状の低級アルキル基、アミノ基、前記した低級アルキル基で置換されているアミノ基、前記した低級アルキル基からなる低級アルコキシ基などが挙げられる。

【0016】芳香族基が有するカチオン性の基としては、アンモニウム基やスルホニウム基などが挙げられるが、第四級アンモニウム基が好ましい。本発明のカチオン性の基は芳香族基の置換基として有していてもよいが、芳香族基の異種原子がカチオン化されたものであってもよい。カチオン性の基を有する芳香族基としては、例えば、4-N, N, N-トリメチルアミノフェニル基、4-N, N, N-トリエチルアミノフェニル基などの4-N, N, N-トリ低級アルキルアミノフェニル基、N-メチル-4-ピリジル基、N-エチル-4-ピリジル基などのN-低級アルキル-4-ピリジル基などが挙げられる。

【0017】本発明の前記一般式(1)の $Ar_1$ 、 $Ar_2$ 、 $Ar_3$ 、及び、 $Ar_4$ の少なくとも1個はカチオン性の基を有する芳香族基であるが、好ましくはこれらの芳香族基のうちの2個以上がカチオン性の基を有するものである。本発明の前記一般式(1)で表されるカチオン性金属ポルフィリン錯体のポルフィリン環部分のものとしては、 $Ar_1$ 、 $Ar_2$ 、 $Ar_3$ 、及び、 $Ar_4$ の全てが、N-メチル-4-ピリジル基などのN-低級アルキル-4-ピリジル基、又は、4-N, N, N-トリメチルアミノフェニル基などの4-N, N, N-トリ低級アルキルアミノフェニル基である化合物、 $Ar_1$ 、 $Ar_2$ 、及び、 $Ar_3$ がN-メチル-4-ピリジル基などのN-低級アルキル-4-ピリジル基、又は、4-N, N, N-トリメチルアミノフェニル基などの4-N, N, N-トリ低級アルキルアミノフェニル基であり、 $Ar_4$ がフェニル基である化合物、 $Ar_1$ 、及び、 $Ar_2$ がN-メチル-4-ピリジル基などのN-低級アルキル-4-ピリジル基、又は、4-N, N, N-トリメチルアミノフェニル基などの4-N, N, N-トリ低級アルキルアミノフェニル基であり、 $Ar_3$ 、及び、 $Ar_4$ が

フェニル基である化合物、 $Ar_1$ 、及び、 $Ar_3$ がN-メチル-4-ピリジル基などのN-低級アルキル-4-ピリジル基、又は、4-N, N, N-トリメチルアミノフェニル基などの4-N, N, N-トリ低級アルキルアミノフェニル基であり、 $Ar_2$ 及び $Ar_4$ がフェニル基である化合物などが挙げられる。

【0018】本発明の前記一般式(1)における中心金属Mとしては、SOD活性や抗癌作用を示すものであれば特に制限はないが、好ましくは、鉄原子、銅原子又はマンガン原子などが挙げられる。

【0019】本発明の前記一般式(1)で表されるカチオン性金属ポルフィリン錯体は、公知の方法に従って製造することができる。例えば、ピロールと芳香族アルデヒドとを反応させてポルフィリン環部分を製造し、これをハロゲン化低級アルキルや低級アルキルトシレートなどのアルキル化剤でカチオン化し、次いで金属又は金属化合物、例えば金属ハロゲン化物などを用いて金属錯体とする方法により製造することができる。

【0020】本発明者らは、癌細胞としてウォーカーラット(Walker rat)癌由来のLLC・WRC・256細胞及びSOD活性の異なる数種の癌細胞を用いて、各種の金属ポルフィリン錯体の抗癌作用を検討した。この試験の手順を模式的に図1に示す。なお、試験を行った化合物とその略称は次の通りである。

【0021】FeTM4PyP：一般式(1)の $Ar_1$ 、 $Ar_2$ 、 $Ar_3$ 、及び、 $Ar_4$ が、N-メチル-4-ピリジル基である鉄錯体。

MnTM4PyP：一般式(1)の $Ar_1$ 、 $Ar_2$ 、 $Ar_3$ 、及び、 $Ar_4$ が、N-メチル-4-ピリジル基であるマンガン錯体。

CuTM4PyP：一般式(1)の $Ar_1$ 、 $Ar_2$ 、 $Ar_3$ 、及び、 $Ar_4$ が、N-メチル-4-ピリジル基である銅錯体。

FeTMAP：一般式(1)の $Ar_1$ 、 $Ar_2$ 、 $Ar_3$ 、及び、 $Ar_4$ が、4-N, N, N-トリメチルアミノフェニル基である鉄錯体。

FeTSP：一般式(1)の $Ar_1$ 、 $Ar_2$ 、 $Ar_3$ 、及び、 $Ar_4$ が、4-スルホネートフェニル基である鉄錯体。

【0022】ポルフィリン溶液の調製は培養液を用いて行い、ポルフィリン濃度が最終的に10、50、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調整した。測定は12穴プレートに展開した癌細胞に金属ポルフィリン錯体溶液を添加し培養し、添加3日後にトリパンブルー染色法により各癌細胞の細胞生存率を測定し抗癌効果を評価した。

【0023】また、これらの金属ポルフィリン錯体のSOD活性を、T. Ohse, et al., Porphyrins, 6, 137 (1997)に記載されている方法に準じて、ストップフロー法による活性酸素( $O_2 \cdot$ )の不均化速度定数( $k_{cat}$ )により評価した。 $k_{cat}$ はポルフィリン錯体

のHEPES/HEPES・Na緩衝液(pH8.1)とKO<sub>2</sub>のDMSO溶液とを36℃で反応させ、O<sub>2</sub>・の極大吸収波長である245nmの吸光度の減衰から求めた。金属ポルフィリン錯体及び抗酸化酵素におけるk<sub>cat</sub>及びIC<sub>50</sub>を次の表2に示す。なお、k

catの値が大きいほど、また、IC<sub>50</sub>の値が小さいほどSOD活性は高い。

【0024】

【表2】

表2 各種ポルフィリン錯体のk<sub>cat</sub>値とIC<sub>50</sub>

試験化合物	k <sub>cat</sub> [×10 <sup>-4</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	IC <sub>50</sub> [μg/ml]
Cu, Zn-SOD	23.10	0.3
FeTM4PyP	22	0.8
FeTM4PyMPP	5.4	1.6
FeDM4PyDPP	3.8	1.8
MnTM4PyP	22	0.7
FeTSPP	---	---

【0025】さらに、癌細胞が有する細胞内SOD活性は細胞のホモジネート溶液を調製し、CLAを用いた化学発光法により算出した。そして、発生したラジカル種(・OH)は、スピントラップ剤としてDMPOを用いたESRにより測定した。

【0026】図2に、LLC・WRC・256細胞による、発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体(100μg/ml)及びウシ赤血球由来の抗酸化酵素(50μg/ml)を用いた癌細胞の死滅率を示す。LLC・WRC・256細胞のトリパンブルー染色法による細胞生存率評価の結果、抗酸化酵素はSOD活性は有しているがそれ自体は抗癌効果が極めて低いものである。また、金属の比較ではSOD活性および・OH産生能の高いFeTM4PyPが最も高い抗癌効果を示した。優れたSOD活性を有するMn錯体はあまり効果が認められなかったのはMn錯体の低い・OH産生能によるものと考えられる。一方、Fe錯体同様優れた・OH産生能を示すCu錯体では、SOD活性が低いため、Fe錯体に比べて抗癌効果は低いものとなったと考えられる。

【0027】また、前記の結果をSOD活性の指標となる活性酸素(O<sub>2</sub>・)の不均化速度定数(k<sub>cat</sub>)の値と共に図3に示す。図3中の数値は、10<sup>6</sup>×k<sub>cat</sub>(M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)であり、因みに抗酸化酵素の値は2300×10<sup>6</sup>(M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)であった。

表3 各種ポルフィリン錯体の癌細胞への集積能

試験化合物	取り込み量 [fmol/細胞]
FeTM4PyP	1.4 ± 0.1
FeTM4PyMPP	1.9 ± 0.2
FeDM4PyDPP	11 ± 0.8
MnTM4PyP	1.4 ± 0.2
FeTSPP	1.0 ± 0.1

【0032】この結果、疎水性の強いポルフィリン錯体ほど集積能が高いことが確認された。特にFeDM4P

【0028】次に本発明者らは、カチオン性金属ポルフィリン錯体の癌細胞への集積能について検討した。脂質膜二重層からなる細胞膜との親和性や透過性を考察するために、親水性、疎水性の異なる次の化合物について試験した。

【0029】FeTM4PyP：一般式(1)のAr<sub>1</sub>、Ar<sub>2</sub>、Ar<sub>3</sub>、及び、Ar<sub>4</sub>が、N-メチル-4-ピリジル基である鉄錯体。

FeTM4PyMPPP：一般式(1)のAr<sub>1</sub>、Ar<sub>2</sub>、及びAr<sub>3</sub>が、N-メチル-4-ピリジル基であり、Ar<sub>4</sub>がフェニル基である鉄錯体。

Fecis-DM4PyDPP：一般式(1)のAr<sub>1</sub>、及びAr<sub>2</sub>が、N-メチル-4-ピリジル基であり、Ar<sub>3</sub>、及びAr<sub>4</sub>がフェニル基である鉄錯体。

Fetrans-DM4PyDPP：一般式(1)のAr<sub>1</sub>、及びAr<sub>3</sub>が、N-メチル-4-ピリジル基であり、Ar<sub>2</sub>、及びAr<sub>4</sub>がフェニル基である鉄錯体。

【0030】癌細胞への集積挙動は蛍光顕微鏡を用いてポルフィリン錯体の赤色蛍光を観察することにより確認した。さらに原子吸光分析より細胞内のポルフィリン錯体を定量した。結果を次の表3に示す。

【0031】

【表3】

yDPPは短時間のうちに多くの錯体が癌細胞に取り込まれた。ポルフィリン錯体に疎水性基が導入されること

により、疎水的な細胞膜との相互作用が強くなり集積能が増大したと考えられる。

【0033】また、これらの化合物 ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) についての抗癌効果の経時的な変化を測定した。この結果を図4に示す。図4中の黒三角印は  $\text{FeTM4PyP}$  を、黒丸印は  $\text{FeTM4PyMPP}$  を、黒四角印は  $\text{FeDM4PyDPP}$  をそれぞれ示している。使用した癌細胞は、ウォーカーラット (Walker rat) 癌由来の  $\text{LLC} \cdot \text{WRC} \cdot 256$  細胞であり、各化合物を  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で使用した。図4の縦軸は癌細胞の生存率を示しており、100%は全癌細胞が生きている状態を示している。

【0034】メソ位にフェニル基2個を有する  $\text{FeDM4PyDPP}$  は、添加後24時間以内でほぼ全ての癌細胞を死滅させた。抗癌効果は、 $\text{FeDM4PyDPP} > \text{FeTM4PyP} > \text{FeTM4PyMPP}$  の順で減少した。

【0035】 $\text{LD}_{50}$  (Median Lethal Dose: 細胞を50%死滅させるのに必要な薬剤の量) の値を測定した結果を表4に示す。表4に、併せて前述した方法で測定したSOD活性についての  $k_{\text{cat}}$  の値を示す。

【0036】

【表4】

試験化合物	$k_{\text{cat}}$	$\text{LD}_{50}$
	$[\times 10^{-3} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$[\mu\text{M}/\text{ml}]$
$\text{FeTM4PyP}$	22	46
$\text{FeTM4PyMPP}$	5.4	150
$\text{FeDM4PyDPP}$	3.8	24
$\text{FeTM4PyP}$	22	--
$\text{FeTSPP}$	---	--

【0037】不均化速度定数 ( $k_{\text{cat}}$ ) は、カチオン性置換基の減少と共に低下し、 $\text{FeTM4PyP} > \text{FeTM4PyMPP} > \text{FeDM4PyDPP}$  の順となった。しかし、 $\text{FeDM4PyDPP}$  は低いながらもSOD活性を有しており高い集積能が優れた抗癌作用を誘発させた。つまり、 $\text{FeDM4PyDPP}$  の疎水性により癌細胞への集積が著しく増大することによりカチオン性置換基の減少によるSOD活性の低下を補い、優れた抗癌作用を示したと考えられる。以上のことから、癌細胞への集積能はカチオン性金属ポルフィリン錯体が示す抗癌効果において重要な因子であることがわかった。

【0038】次に本発明の化合物の正常細胞に対する作用を検討した。まず、本発明の化合物及び公知の抗癌抗生物質であるマイトマイシンCを用いて、正常細胞 ( $\text{BRL-3A}$ ) の生育実験を行った。結果を図5に示す。図5中の黒丸印はコントロールを示し、黒四角印は  $\text{FeTM4PyP}$  を添加した場合を示し、黒三角印は  $\text{MnTM4PyP}$  を添加した場合を示し、白丸印はマイトマイシンCを添加した場合を示す。従来の抗癌剤であるマイトマイシンCを添加した場合には、時間の経過と共に細胞数が減少し、約70時間後には0になる。一方、本発明の化合物の場合にはほぼコントロールと同様に細胞の増殖が行われている。即ち、本発明の化合物は正常細胞にはほとんど影響を与えないことがわかる。

【0039】さらに、本発明の化合物である  $\text{FeTM4PyP}$  を種々の濃度で、正常細胞 ( $\text{BRL-3A}$  細胞) と癌細胞 ( $\text{Walker 256}$  細胞) の培養液中に添加して、各細胞の生存率を測定した。結果を図6に示す。

図6中の白丸印は癌細胞の生存率を示し、黒丸印は正常細胞を示す。癌細胞では、 $\text{FeTM4PyP}$  の濃度が  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  でその生存率が約50%程度に、さらに濃度が  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  では約40%程度に低下するのに対して、正常細胞においては、濃度を上げていってもその生存率はほとんど低下せず、本発明の化合物が正常細胞に対してはほとんど影響を与えないことがわかる。

【0040】以上の結果から、本発明の有効成分は、多くの活性酸素を有する癌細胞において特異的にヒドロキシラジカルを発生させることにより抗癌効果を奏するものであることが判明した。このようなメカニズムによる抗癌剤は、本発明者らによる新規な着想に基づくものであり、本発明は新規なメカニズムによる癌細胞に特異的な新規な抗癌剤を提供するものである。また、本発明の医薬組成物は、経口又は非経口により投与することができ、その有効投与量は、病態や患者により相違するが、一般的には  $1 \mu\text{g} \sim 1 \text{g}$  を1日数回に分けて投与するか連続的に投与する。本発明の医薬組成物は公知の方法により、製剤化することができ、投与方法や患者により適宜製剤することができる。

【0041】

【実施例】次に本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0042】実施例1 (ポリフリン環の合成)

三つ口フラスコにあらかじめ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で脱水しておいたプロピオン酸  $300 \text{ml}$  を入れ、窒素下、 $110^\circ\text{C}$  でベンズアルデヒド  $7.5 \text{ml}$  ( $0.0707 \text{mol}$ )、

ピリジン-4-アルデヒド 12.5 ml ( $0.1165 \text{ mol}$ ) を入れ、攪拌、遮光した。次いで、ピロール 12.5 ml ( $0.1863 \text{ mol}$ ) をゆっくり滴下した。2時間反応させた後、溶媒を留去した。アンモニア水で中和し、また溶媒を留去した。100℃で減圧乾燥を行った。メタノールで洗浄、過剰、残渣を減圧乾燥した。フラッシュカラム（固定相：シリカゲル、展開溶媒：塩化メチレン 100% → メタノール 5% / 塩化メチレン 95%）でポルフィリン（TPP、MPyTPP、DPyDPP、TPyMPP、TPyP）を分離精製した。今回は DPyDPP の *cis* 体、*trans* 体を分離することはできなかった。各ポルフィリンの単離は NMR で確認した。収率は約 2% だった。

【0043】実施例 2（ポルフィリンのメチル化（メソ位のピリジル基の N 原子の四級化））

三つ口フラスコにエタノール 10% (3 ml) / クロロホルム 90% (27 ml) の溶媒を入れ、各ポルフィリン（MPyTPP の場合 0.077 g ( $1.3 \times 10^{-4} \text{ mol}$ )、DPyDPP の場合 0.235 g ( $3.8 \times 10^{-4} \text{ mol}$ )、TPyMPP の場合 0.251

g ( $3.9 \times 10^{-4} \text{ mol}$ ) を加えた。メチル化する N 原子の数の約 4 倍モル量の p-トルエンスルホン酸メチル（MPyTPP に対しては 0.120 ml ( $6.4 \times 10^{-4} \text{ mol}$ )、DPyDPP に対しては 0.57 ml ( $3.1 \times 10^{-3} \text{ mol}$ )、TPyMPP に対しては 0.88 ml ( $4.7 \times 10^{-3} \text{ mol}$ )）を加え、35℃、窒素下で遮光して終夜反応させた。溶媒を留去後、減圧乾燥を行い MMPyTPP（MPyTPP をメチル化したもの）、DPyDPP（DPyPPP をメチル化したもの）、TMPyMPP（TPyMPP をメチル化したもの）を得た。

【0044】TMPyMPP はこの後微量のメタノールに溶かしてジエチルエーテル中で再沈させ、母液後残渣を回収した。DMPyPPP の方は非常に難溶なので、この過程は行わなかった。十分に減圧乾燥を行った。また MMPyTPP は水に不溶であったので、ここでは使用することができなかった。各メチル化の確認は NMR で行った（図 7、図 8 及び図 9 参照）。収率は約 45% だった。

【0045】

$^1\text{H-NMR}$  [270 MHz、DMSO- $d_6$ ] :  $\delta$

DMPyDPP

9.48 (8H、2, 6-ピリジル)

9.20 (8H、ピロール- $\beta$ )

9.00 (8H、3, 5-ピリジル)

4.73 (12H、N-メチル)

-3.10 (2H、内部ピロール)

TMPyMPP

9.71-7.30 (46H)

4.96 (9H、N-メチル)

-2.74 (2H、内部ピロール)

TMPyP

9.44-7.07 (40H)

4.71 (6H、N-メチル)

-2.90 (2H、内部ピロール)

【0046】実施例 3（ポルフィリンへの金属（Fe）導入）

三つ口フラスコにコハク酸緩衝液（pH 4.05）を 150 ml 入れ、80℃、窒素下で、各ポルフィリン（DMPyDPP の場合は 0.257 g ( $2.7 \times 10^{-4} \text{ mol}$ )、TMPyMPP の場合は 0.207 g ( $1.8 \times 10^{-4} \text{ mol}$ )）を加え、塩化鉄（ $\text{FeCl}_3$ ）4 水和物をポルフィリンの約 10 倍モル量（DMPyDPP に対して 0.425 g ( $2.1 \times 10^{-3} \text{ mol}$ )、TMPyMPP に対して 0.382 g ( $1.9 \times 10^{-3} \text{ mol}$ )）入れ、1時間ごとに UV-Vis スペクトルを測定し、ピークのシフト、吸光度から金属導入が確認できるまで反応させた。溶媒を留去後、カラム（固定相：イオン交換樹脂 HP20、展開溶媒：水 → 水 10% / メタノール 90%）で遊離した鉄を分離し、溶媒を留去後減圧乾燥を行い FeDMPyDPP、FeTMPyMPP を得た。収率は約 70% だった。

【0047】実施例 4（細胞培養）

凍結保存しておいた細胞を 37℃ の温水で解凍した後、遠沈管に移し、10 分間、1000 回転で遠心分離し、上澄みを捨てて凍結保存の際に用いる DMSO を除き、培養液（以下、MEM と表す。）を入れ懸濁後、培養フラスコに移し培養器内（37℃、炭酸ガス下）で培養した。2-3 日おきに MEM を交換し、十分に細胞が増殖した後、トリプシン処理して細胞をフラスコからはがし遠沈管に移し、10 分間、1000 回転で遠心分離後上澄みを捨て MEM を加え懸濁後、いくつかのフラスコに移し（継代）、細胞を増殖させた。この際、LLC-WRC-256 細胞は Eagle's essential medium（以下、E-MEM と表す。）、BR L-3A 細胞は Ham's F-12K（以下、F-12K と表す。）を用いて培養した。

【0048】実施例 5（制癌活性評価）

継代培養した細胞をトリプシン処理で培養フラスコよりはがし、遠沈管に移し、10 分間、1000 回転で遠心分離後、上澄みは捨て MEM を加え懸濁後、12 穴のデ

ィッシュに1穴につき1mlずつ加えた。1日培養器で培養して細胞を着床させてから、終濃度が10-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように調製した各ポルフィリン錯体及びマイトマイシンC、又はカルボプラチンを添加し、培養器に入れた。評価は一定時間経過後(0.5~120時間後)に培養器から取り出し、トリパンブルー溶液で死滅細胞を染色することで行った。一定時間経過後、MEMを吸引し、PBSで洗浄後、トリパンブルー溶液を入れ、15分間培養器に入れた。吸引後PBSで洗浄し、再びPBSを入れ、培養顕微鏡(OLYMPUS 倒立型培養顕微鏡IMT-2)で観察し、写真撮影(OLYMPUS 顕微鏡写真自動露出撮影装置model PM-10-A)を行った。得られた写真からトリパンブルーで染色された死滅細胞と染まっていない生細胞の数を計測し、細胞生存率を算出した。以上の手順を図1に模式的に示す。

#### 【0049】

【発明の効果】本発明は、癌細胞に多量に存在する活性酸素をヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )に変換することにより癌細胞を特異的に死滅させるという新規なメカニズムによる癌の治療方法及びこの方法による新規な抗癌剤を提供するものである。本発明の抗癌剤は、正常細胞に対する副作用が少なく、安全で且つ治療効果の高いものである。また、本発明は、癌細胞の増殖抑制および抗癌作用を有する新規な金属ポルフィリン錯体を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、癌細胞の生存率を測定方法を模式的に

示したものである。

【図2】図2は、本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体及び抗酸化酵素の癌細胞に対する死滅率をグラフ化して示したものである。

【図3】図3は、各種金属ポルフィリン錯体及び抗酸化酵素の癌細胞に対する死滅率をグラフ化し、そのSOD活性の $k_{cat}$ 値を示したものである。

【図4】図4は、本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体の癌細胞に対する生存率をグラフ化して示したものである。図4中の黒三角印は $\text{FeTM4PyP}$ を、黒丸印は $\text{FeTM4PyMPP}$ を、黒四角印は $\text{FeDM4PyDPP}$ をそれぞれ示している。

【図5】図5は、本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体及び公知の抗癌剤における正常細胞に対する作用をグラフ化して示したものである。

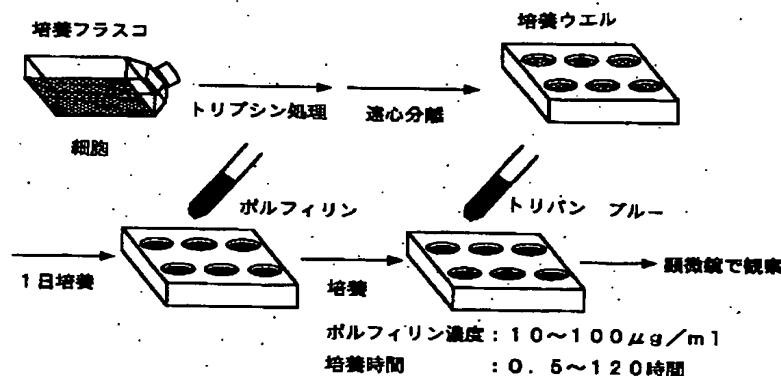
【図6】図6は、本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体による癌細胞及び正常細胞への影響をグラフ化して示したものである。

【図7】図7は、本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体(DMPyDPP)の金属化前の化合物のNMRチャートを示したものである。

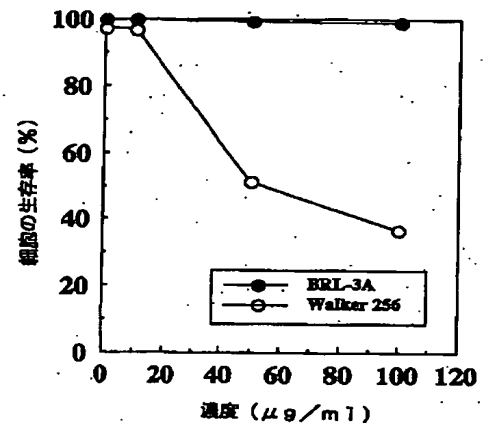
【図8】図8は、本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体(TMPyMPP)の金属化前の化合物のNMRチャートを示したものである。

【図9】図9は、本発明のカチオン性金属ポルフィリン錯体(TMPyP)の金属化前の化合物のNMRチャートを示したものである。

【図1】

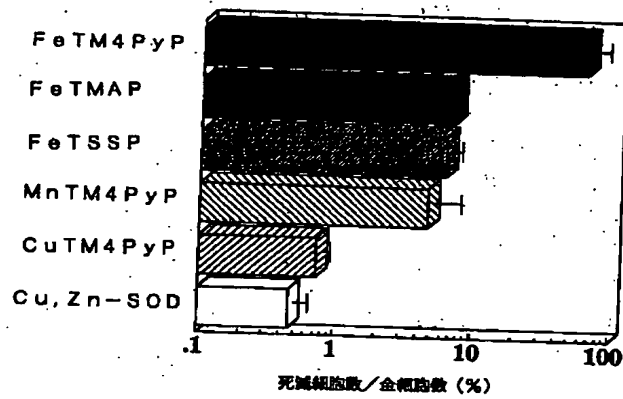


【図6】

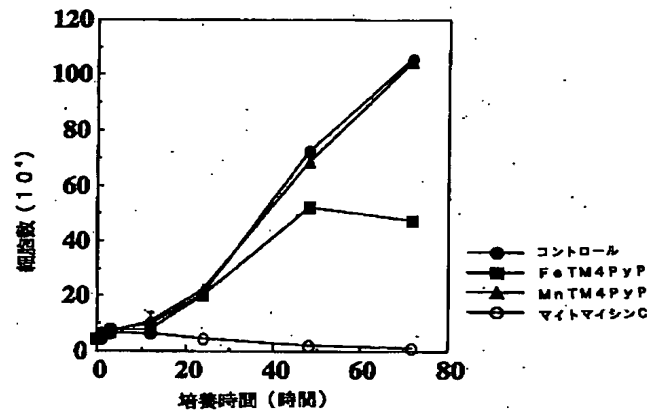




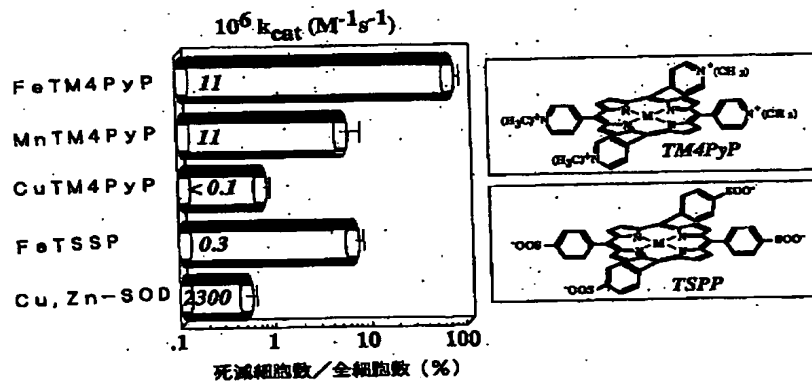
【図2】



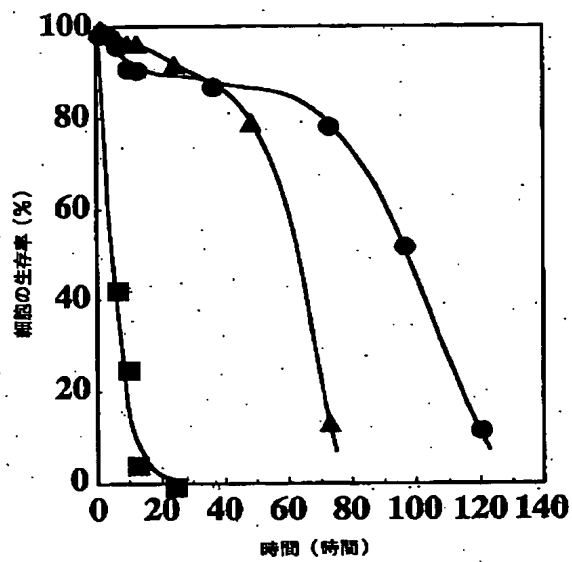
【図5】



【図3】

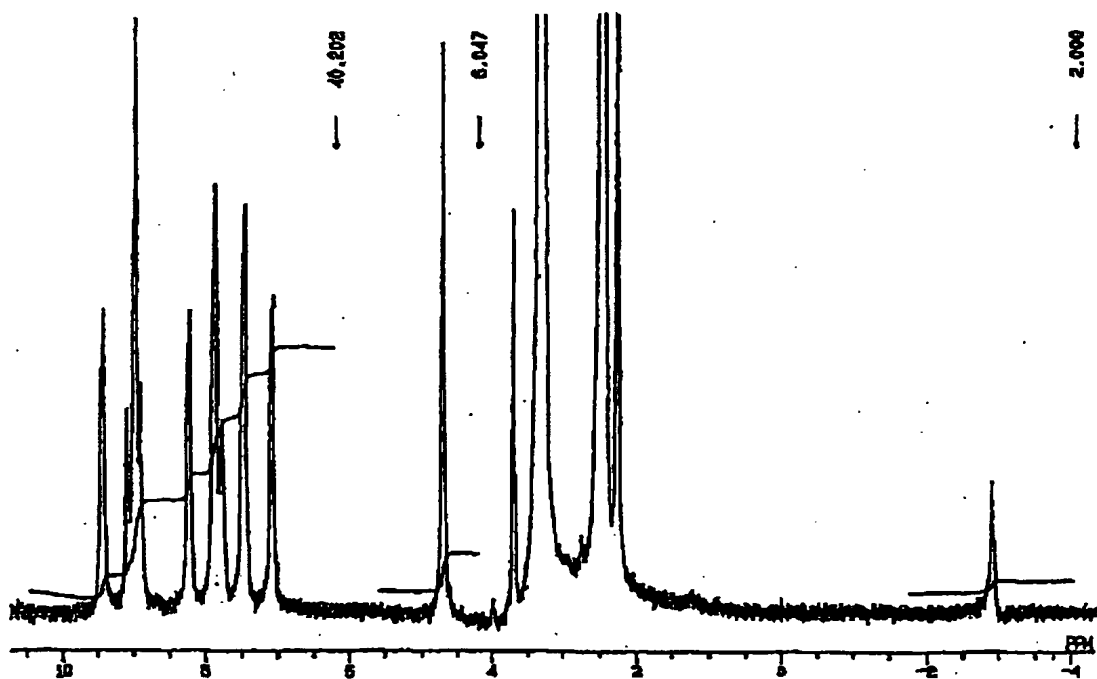


【図4】

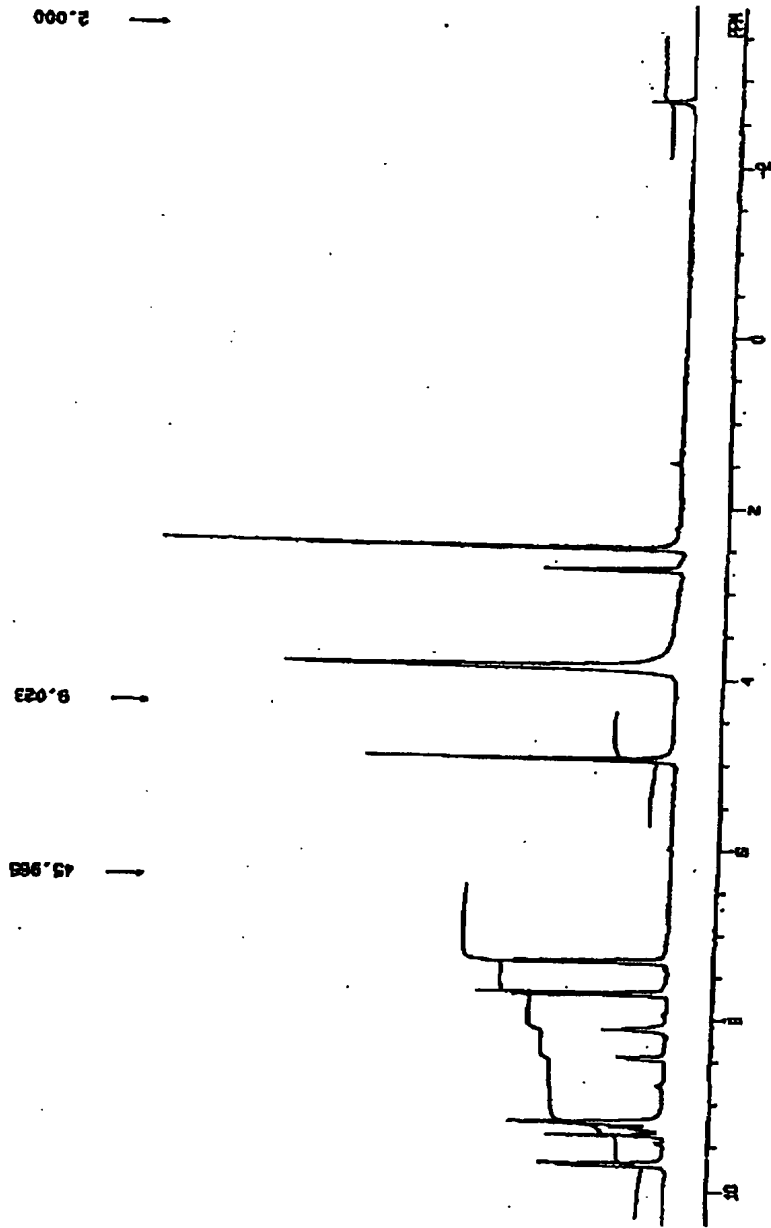


▲ : FeMPy<sub>4</sub>P  
● : FeMPy<sub>3</sub>P<sub>1</sub>P  
■ : FeMPy<sub>2</sub>P<sub>2</sub>P

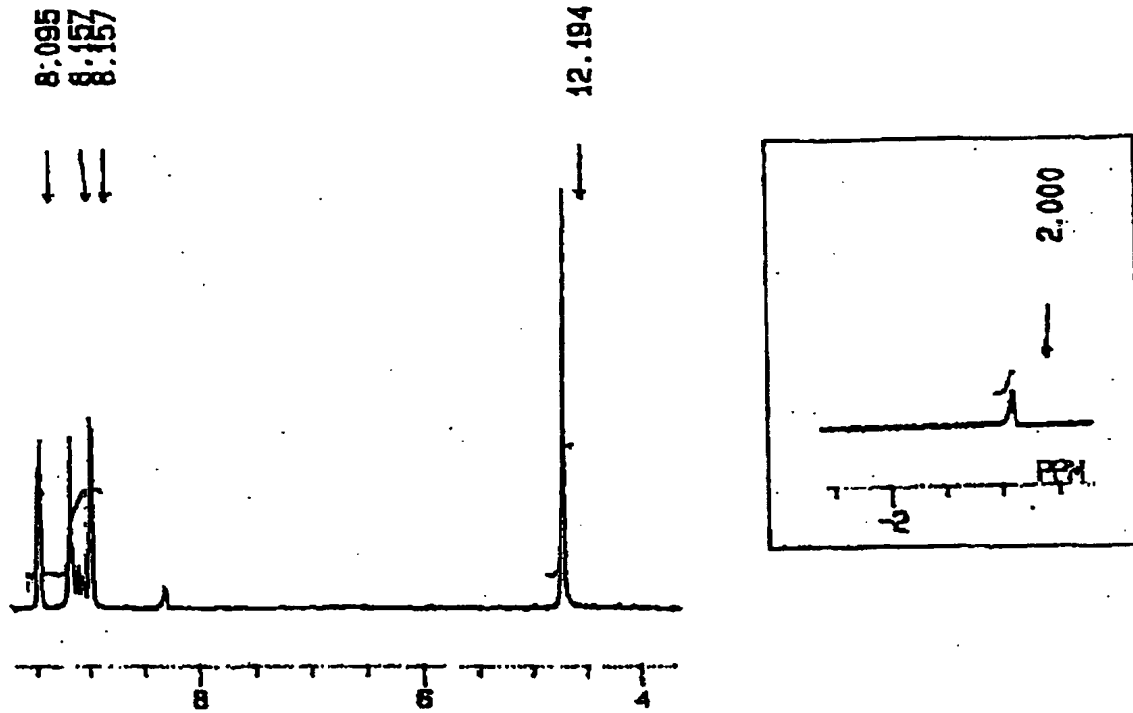
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(72)発明者 長岡 昭二  
神奈川県鎌倉市七里が浜東5丁目4番10-  
2  
(72)発明者 中村 國衛  
神奈川県相模原市古淵5丁目11番1号

(72)発明者 大瀬 俊之  
東京都町田市小山田桜台1丁目11番74-  
502  
(72)発明者 村瀬 徹  
東京都八王子市南大沢2丁目206番地20号  
コンフォール河井102号室  
Fターム(参考) 4C050 PA05  
4C086 AA01 AA02 AA03 CB04 MA01  
MA04 ZB26 ZC41